Archive of SID

فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ۳، شمارهٔ ٤، زمستان ۱۳۹۳، صفحه ۸۱- ۹۲

اثر پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس (*Pediococcus pentosaceus*) بر عوامل رشد و ایمنی تاس‌ماهی سیبری(*Acipenser baerii*)

فاطمه مصلحی[1*] ، مسعود ستاری[2]، مجید رضا خوش خلق[3]، علیرضا شناور ماسوله[4]، علیرضا عباسعلی زاده[5].

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا

۲- دانشیار بهداشت و بیماریهای آبزیان، شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا

۳- استادیار ژنتیک مولکولی، شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا

٤- استادیار بهداشت آبزیان، مؤسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر، گیلان، رشت

۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد، مجتمع تکثیرو پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی. گیلان، رشت

تاریخ دریافت:۹۳/۲/۹ تاریخ پذیرش:۹۳/۱۱/۱

*نویسنده مسئول مقاله: moslehitanaz@yahoo.com

چکیده

تأثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس (*Pediococcus pentosaceus*) بر عوامل رشد و ایمنی تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) **با** وزن متوسط ۰/۰۱±۱٤۳ گرم بررسی شد. تعداد ۱۸۰ ماهی به‌صورت کاملاً تصادفی در ۱۲ وان فایبرگلاس (۱۵ ماهی در هر وان) توزیع و با چهار تیمار غذایی حاوی $۱۰^{۷}$،$۱۰^{۸}$،$۱۰^{۹}$ سلول پروبیوتیک در هر گرم جیره و تیمار شاهد فاقد پروبیوتیک در سه تکرار به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. بهبود معناداری در شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی (FCR) ، نرخ کارایی پروتئین (PER)، رشد ویژه (SGR) و درصد افزایش وزن بدن (BWI) در گروه‌های تغذیه شده با تیمار پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. نتایج بیانگر بهبود چشمگیر در شاخص‌های لایزوزیم، فعالیت آلترناتیوکمپلمان و ایمنوگلوبولین M ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بود. بهترین نتایج از بررسی عوامل ایمنی در گروه تغذیه شده از جیره حاوی $۱۰^{۹}$ سلول باکتریایی مشاهده شد.

کلیدواژگان: *Acipenser baerii* ، پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس، فاکتورهای رشد، ایمنی، تاس‌ماهی سیبری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

همگام با افزایش روبه رشد آبزی پروری، چالش‌هایی نظیر شیوع بیماری و کیفیت آب به ضررهای اقتصادی در این صنعت منجر شده است، به گونه‌ای که بروز عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی سبب ضررهای اقتصادی چشم‌گیری شده است (Martınez Cruz et al., 2012). دستگاه گوارش ماهی یکی از مسیرهای مهم برای ورود عوامل بیماری‌زا به بدن است. در این بین بیوتای میکروبی روده از عوامل دفاعی مهم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا است (Merrifield et al., 2009)، اما این عامل به تنهایی نمی‌تواند از ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا دفاع کند.

از روش‌های سنتی پیشگیری و درمان بیماری‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی است. در سال‌های گذشته مطالعات نشان داد که استفاد از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب ضررهای زیادی در آبزی‌پروری می‌شود. از جمله این ضررها می‌توان به بالا رفتن هزینه تولید (Al-Dohail et al., 2009)، انباشتگی در محیط و در نتیجه آلوده کردن محیط (Wang et al., 2008؛ et al., 2009 Al-Dohail)، انباشتگی در بدن آبزی (Nik khoo et al., 2010) و در نهایت ایجاد سویه‌های مقاوم در بدن میزبان (He et al., 2011) اشاره کرد. علاوه بر موارد مذکور، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی سبب استرس‌های زیاد در آبزیان می‌گردد (Son et al., 2009). این موارد باعث شد تا دانشمندان در پی یافتن جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. در پی انجام بررسی‌های زیاد مشخص شد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شوند (Son et al., 2009). استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران است که برای بیماری‌های آبزیان، به‌صورت طبیعی و بیولوژیک استفاده می‌شود.

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده هستند که از طریق بهبود بالانس میکروبی روده اثرهای مفیدی را در میزبان ایجاد می‌کنند (Fuller, 1989; Wang et al., 2008). پروبیوتیک‌ها انواع مختلفی دارند که از آنها می‌توان به میکروآلگ‌ها، مخمرها، باکتریوفاژها و برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اشاره کرد (Irianto and Austin, 2002).

از مزایای پروبیوتیک‌ها می‌توان به مواردی از قبیل دفع رقابتی به‌صورت ممانعت از کلنی‌سازی عوامل بیماری‌زا در دستگاه گوارش و یا رقابت بر سر فضا، غذا و اکسیژن با باکتری بیماری‌زا، بهبود مصرف غذا از طریق تحریک اشتها و یا شکستن ترکیبات غیرقابل هضم موجود در جیره به‌وسیله آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز و همچنین تولید ویتامین‌هایی مانند بیوتین و ریبوفلاوین، افزایش رشد و بقا و افزایش ایمنی هومورال و سلولی در میزبان از طریق تولید ترکیبات ممانعت کننده و... اشاره کرد (Austin, Irianto and 2002).

پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس (*Pediococcus pentosaceus*، باکتری گرم مثبت، غیرمتحرک، فاقد هاگ، بی‌هوازی و به شکل کروی است که به‌عنوان باکتری اسید لاکتیک طبقه‌بندی می‌شود. این باکتری از روده تاس‌ماهیان ایرانی جدا و به‌صورت پودر به میزان 10^{12} سلول در گرم در پارک علم و فناوری گیلان تهیه شد.

ماهیان خاویاری از با ارزش‌ترین گونه‌های آبزی هستند زیرا هم به لحاظ تولید گوشت و هم خاویار ماهیان ارزشمندی می‌باشند. طی دو دهه گذشته ذخایر طبیعی آن‌ها به‌شدت کاهش یافته است (Nelson et al., 2012). بیماری‌های جدید در این ماهیان ضررهای اقتصادی چشم‌گیری را در صنعت پرورش آن ها ایجاد کرده است.

تاس‌ماهی سیبری از جمله ماهیان خاویاری است که در تولید خاویار پرورشی نقش دارد، بنابراین از نظر اقتصادی

www.SID.ir

Archive of SID

و تجاری ماهیان با ارزشی هستند. این ماهی یک گونه وارداتی است که از جمله ماهیان رودکوچ بوده و به‌آسانی با شرایط اسارت و پرورش سازگار می‌شود. سرعت رشد بالایی دارد و به‌خوبی تغییرات را تحمل می‌کند. تاس‌ماهی سیبری به‌راحتی غذای دستی را می‌پذیرد و در سن پایین به بلوغ می‌رسد، از این‌رو خاویاردهی سریعی دارد (Pyka and Kolman, 2003).

باکتری پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی یکی از جنس‌های گونه پدیوکوکوس است که Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) از این باکتری در جیره تیلاپیای قرمز (*Oreochromis niloticus*) استفاده کردند و در نهایت مشاهده شد که این باکتری عوامل رشد را بهبود می‌بخشد، اما این بهبود رشد معنادار نیست. این باکتری توانسته بود باعث افزایش معناداری در فعالیت لایزوزیم گروه تغذیه‌شده با پروبیوتیک به نسبت گروه شاهد شود. یک سال پس از این مطالعه، محققان از همین باکتری در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کردند (Merrifield et al.,2011). نتایج آنها از این قرار بود که این باکتری بر عوامل رشد به‌طور معنادار تأثیر ندارد، همچنین سطوح لایزوزیم در ماهیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک تحت تأثیر باکتری قرار نگرفت.

استفاده از مخمر به‌عنوان پروبیوتیک در جیره فیل ماهی (*Huso huso*) نشان داد که عوامل رشد در این ماهی بهبود معناداری پیدا کرد (Askarian et al., 2011).

نتیجه مطالعات نشان داد که اثر باکتری پدیوکوکوس پنتوساسئوس در تاس‌ماهی سیبری بررسی نشده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر جیره حاوی باکتری پدیوکوکوس پنتوساسئوس بر رشد و ایمنی تاس‌ماهی سیبری در راستای افزایش رشد و ایمنی با استفاده از تولید پروبیوتیک داخلی (رفع عدم نیازمندی به واردات پروبیوتیک) برای این ماهیان ارزشمند است.

مواد و روش‌ها

تهیه پروبیوتیک

پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس از باکتری‌های اسید لاکتیک روده تاس‌ماهیان بومی ایران(*Acipenser persicus*) است. این باکتری با استفاده از ژن 16s rRNA در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۰ شناسایی و استخراج شد. سپس باکتری مورد نظر به‌صورت پودر به میزان 10^{12} سلول در گرم در پارک علم و فناوری گیلان تهیه شد.

تهیه جیره

برای انجام این آزمایش از خوراک ماهی چینه نوع GFT2 استفاده شد (شرکت چینه، تهران، ایران). اندازهٔ پلت در این جیره ٤/٥ میلی‌متر بود که برای ماهیان خاویاری با وزن ۲۵۰-۱۰۰ گرم خوراک مناسبی بود. این جیره برای ماهیان قزل‌آلا طراحی شده بود، اما از آنجا که پلت‌ها حالت فروروندگی سریع داشتند و مهم‌تر اینکه ارزش غذایی این جیره مناسب بود، بنابراین برای پیشبرد سریع‌تر کار از آن استفاده شد.

آنالیز جیره نشان داد که جیره حداقل حاوی ٣٦ درصد پروتئین خام، ١٤ درصد چربی خام، ١ درصد فسفر و حداکثر دارای ١٠ درصد خاکستر، ٤ درصد فیبر و ١١ درصد رطوبت است. از این جیره به‌عنوان جیره پایه استفاده شد. ٢ هفته پیش از شروع آزمایش ماهیان با جیره پایه و شرایط آزمایش کاملاً سازگار شدند.

برای تهیه جیره آزمایشی، پروبیوتیک پودر شده را با میزان تعیین‌شده درون ٥٠٠ سی‌سی سرم فیزیولوژیک مخلوط کرده و بر روی ١٠ کیلوگرم جیره طبق روش Merrifield و همکاران (٢٠٠٩) اسپری شد. از آنجا که این آزمایش در ٤ گروه آزمایشی تحت عنوان TA (گروهی که با میزان 10^{7} سلول باکتریایی در هر گرم جیره تغذیه کردند)، TB (گروهی که با میزان 10^{8} سلول باکتریایی در

www.SID.ir

Archive of SID

هر گرم جیره تغذیه کردند) و TC (گروهی که با میزان 10^9 سلول باکتریایی در گرم جیره تغذیه کردند) و گروه C (که از غذای فاقد پروبیوتیک تغذیه کرد) طراحی شده بود، برای به‌دست آوردن مقدار مورد نیاز سلول باکتری در گرم جیره برای گروه TA به میزان ۰/۲ گرم، برای گروه TB به میزان ۲ گرم و برای گروه TC به میزان ۲۰ گرم پودر پروبیوتیک درون ۵۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژیک مخلوط شد. در حین اسپری کردن محلول حاوی سرم و پروبیوتیک بر روی غذا، غذا با قاشق‌های پلاستیکی مخلوط شد تا باکتری‌ها توزیع یکنواختی در غذا داشته باشند.

طراحی آزمایش

۱۸۰ قطعه تاس‌ماهی جوان سیبری با میانگین وزن ۰/۰۱± ۱٤۳ گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی، استان گیلان تهیه شد. این آزمایش در چهار گروه آزمایشی طراحی شده بود که هر گروه دارای سه تکرار بود. در طی این تحقیق، از ۱۲ وان فایبرگلاس با حجم ۲۰۰۰ لیتری در ابعاد ۲×۲ متر مربع استفاده شد. جریان آب ورودی به‌صورت دائم از طریق لوله‌هایی که در بالای وان قرار گرفته بودند، با دبی ٤ لیتر در دقیقه صورت می‌گرفت. خروجی آب در مرکز قرار داشت. ماهی‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به‌طور مساوی در وان‌ها توزیع شدند، به‌طوری که در هر وان ۱۵ ماهی قرار گرفت. گروه‌های آزمایش از قرار TA، TB و TC بودند که به‌ترتیب با میزان 10^7، 10^8 و 10^9 سلول باکتریایی در هر گرم غذا تغذیه شدند. در این میان گروه شاهد (c) از غذای فاقد پروبیوتیک یا به عبارت دیگر از جیره پایه استفاده کرد.

غذادهی به‌صورت ۳ بار در روز، در ساعات ۸:۰۰، ۱٤:۰۰، ۲۰:۰۰ صورت می‌گرفت. میزان غذای مورد نیاز بر حسب اشتهای ماهی تعیین شد. علاوه بر آن، هر دو هفته یک بار بیومتری صورت می‌گرفت و میزان غذا تغییر داده می شد. به‌طوری که در ٦ هفته اول ماهیان به میزان ۲ درصد وزن بدن و ۲ هفته آخر به میزان ۲/۵ درصد وزن بدن تغذیه می‌شدند.

عوامل کیفی آب در ابتدای دوره اندازه‌گیری شد و پس از آن هر دو هفته یکبار به‌همراه زیست‌سنجی ماهیان، عوامل کیفی نیز سنجیده می‌شد.

رشد

برای بررسی اثر باکتری بر رشد تاس‌ماهی سیبری، عوامل ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی پروتئین، عامل وضعیت، نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن ارزیابی شد. به این ترتیب که پیش از شروع آزمایش، طول و وزن ماهیان به‌ترتیب به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و تخته بیومتری با دقت ۰/۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. زیست‌سنجی اولیه در ابتدای دوره یعنی پیش از شروع آزمایش صورت گرفت. هر دو هفته یک بار زیست سنجی انجام و داده‌های مربوط به وزن و طول ماهیان ثبت شد. ۲٤ ساعت پیش از انجام زیست‌سنجی غذادهی به ماهیان قطع شد. در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر به بررسی تأثیر پروبیوتیک مورد نظر بر رشد تاس‌ماهی سیبری پرداخته شد.

FCR= وزن بدست آمده (گرم)/غذای خورده شده(گرم) (Desilva and Anderson, 1995)

PER= پروتئین خورده شده(گرم)/وزن بدست آمده (گرم) (Helland et al., 1996)

SGR (%day)=(لگاریتم وزن اولیه(گرم)- لگاریتم وزن ۱۰۰×(طول دوره آزمایش)/ نهایی(گرم)) (Hevroy et al., 2005)

CF=3طول (سانتیمتر)/وزن نهایی (گرم) (Austreng, 1978)

BWI= وزن ۱۰۰× وزن اولیه (گرم)/(وزن اولیه(گرم) –وزن نهایی(گرم)) (Piedecausa et al., 2007)

www.SID.ir

Archive of SID

ایمنی

در پایان آزمایش و پس از ۲٤ ساعت گرسنگی، به‌صورت کاملاً تصادفی از هر وان ۲ ماهی برای خون‌گیری خارج شد. خون‌گیری به‌وسیله سرنگ ۲ سی‌سی از بخش زیر باله مخرجی ماهیان صورت گرفت. سپس درون تیوپ‌های اپندورف غیرهپارینه برای انجام مطالعات عوامل ایمنی ریخته شد. نمونه‌های خون برای بررسی عوامل ایمنی به آزمایشگاه تخصصی ویرومد واقع در شهرستان رشت انتقال داده شد. سپس شاخص‌های لیزوزیم، ایمنوگلوبولین و فعالیت آلترناتیو کمپلمان ارزیابی شد.

برای انجام مطالعات ایمنی، خون موجود در لوله‌های اپندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین با سانتریفوژ (مدل Labofuge ساخت شرکت Heraeus sepatch آلمان) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس سرم جدا و با سمپلر به تیوپ‌های اپندورف انتقال و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای سنجش میزان لایزوزیم سرم از روش توصیه شده Ellis, 1990استفاده شد. با استفاده از دستگاه Elisa reader (Awarness, USA) مدل ۲۱۰۰ -Statfax و به روش Turbidomertric (کدورت سنجی) از طریق تحلیل تدریجی باکتری‌های گرم مثبت *Micrococus lysodeikticus* (sigma,USA) به‌دست آمد. به‌طور خلاصه ۵۰ میکرولیتر سرم به ۹۵۰ میکرولیتر محلول باکتری *M. Lysodeikticus* با غلظت ۲۰۰ mg/ml در ۵ % فسفات سدیم (sigma) در pH= ٦/۲ اضافه شد. پس از مخلوط کردن کاهش کدورت در طول موج ۵۳۰ نانومتر در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بعد از ۰/۵ تا ٤/۵ دقیقه مشاهده شد که لیزوزیم سفیده تخم مرغ لیوفیلیزه شده (sigma) نیز به‌عنوان استاندارد استفاده شد. نتایج بر حسب mg ml^{-1} محاسبه شد (Merrifield et al., 2009).

فعالیت همولیتیک مسیر فرعی کمپلمان در سرم بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) و بر اساس روش Ortuno et al., 1998 اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، گلبول‌های قرمز گوسفند سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید- منیزیم- ژلاتین ورنال شسته شد و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار در هر میلی‌لیتر از بافر ۲ ×$۱۰^۸$ cell ml^{-1} تنظیم گردید. سپس نمونه‌های سرم ابتدا ۱۰۰ مرتبه با بافر فوق رقیق شد و حجم‌های متفاوتی از آن تهیه شد و حجم لوله‌ها به کمک بافر فوق به ۲۵۰ میکرولیتر افزایش یافت. سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز گوسفند اضافه شد و پس از انکوباسیون مخلوط حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به هرکدام از لوله‌ها ۳/۱۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم اضافه شد و پس از سانتریفیویوژ کردن در g × ۱٦۰۰ میزان جذب نوری محلول رویی در طول موج ٤۱٤ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین M، روش ایمونوتوربیدی متری (Immunoturbidimetric) است. در این روش IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgMرابطه مستقیم داشته و با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 2100-VISساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج ۳٤۰ نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد (Khoshbavar- Rostami et al., 2006).

آنالیز آماری

ابتدا وضعیت داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف برای طبیعی بودن داده‌ها و آزمون Levene برای همگنی واریانس‌ها بررسی شد. پس از اطمینان از طبیعی

www.SID.ir

Archive of SID

بودن داده‌ها، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) استفاده شد و اختلاف بین میانگین‌ها به روش آزمون Duncan بررسی شد. تمامی داده‌های درون متن به‌صورت Mean± SE نشان داده شده است. ترسیم نمودارها و تمام آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS (version 16) در سطح خطای ۰/۰۵ و Excel 2007 انجام شد.

نتایج

برای نشان دادن اثر پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس بر رشد تاس‌ماهی سیبری، به محاسبه عوامل رشد از قبیل، FCR، SGR، PER،BWI و CF پرداخته شد.

نتایج حاصل از داده‌های FCR نشان داد که بالاترین میزان FCR در گروه شاهد بود که تفاوت معناداری با دیگر گروه‌ها داشت (p<۰/۰۵)، اما بین ۳ گروه تغذیه‌شده با جیره حاوی پروبیوتیک در میزان FCR تفاوت معناداری یافت نشد (p>۰/۰۵).

نتایج حاصل از PER بیان کرد که بیشترین مقدار آن در گروه TA یعنی گروهی که با میزان 10^7 سلول باکتری در گرم غذای خشک تغذیه‌شده، بود به‌طوری که میزان PER موجود در این گروه تفاوت معناداری با گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵)، اما تفاوتی بین گروه TA با دو گروه TB و TC مشاهده نشد(p>۰/۰۵).

داده‌های BWI نشان داد که این شاخص در TA بیشترین میزان را به خود اختصاص داده است، که میزان آن به‌طور معناداری با گروه شاهد تفاوت داشت (p<۰/۰۵)، اما در بین تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک تفاوت معناداری در داده‌های این شاخص یافت نشد (p>۰/۰۵). در داده‌های مرتبط با شاخص SGR نشان داده شد که بیشترین میزان آن در گروه TA و پس از آن در TC بود. همچنین کمترین میزان این عامل در گروه شاهد یافت شد. تفاوت معناداری بین گروه شاهد با گروه‌های TA و TC مشاهده شد (p<۰/۰۵).

نتایج داده‌های مربوط به CF نیز بیان کرد که هیچ‌گونه تفاوت معناداری بین هیچ کدام از گروه‌های آزمایشی وجود ندارد (p>۰/۰۵). نتایج به‌صورت کلی در جدول ۱ آورده شده است. بنابراین نتایج نشان داد که این باکتری به‌خوبی می‌تواند سبب افزایش رشد تاس‌ماهی سیبری شود به‌طوری که استفاده از این باکتری در جیره باعث شد تا ماهی با خوردن مقدار کمتری از غذا، رشد بهتری داشته باشد.

برای تأثیر پروبیوتیک بر ایمنی، عواملی مانند فعالیت لایزوزیم، آلترناتیوکمپلمان و ایمونوگلوبولین M بررسی شد.

داده‌های حاصل از فعالیت لایزوزیم نشان داد که مقدار لایزوزیم در گروه TC از سایر گروه‌ها بیشتر بود و کمترین مقدار آن در گروه شاهد یافت شد. با این وجود، تفاوت بین گروه‌ها معنادار نبود(p>۰/۰۵). نتایج حاصل از بررسی فعالیت آلترناتیوکمپلمان نشان داد که میزان آن درگروه TC بیشترین مقدار را داشت، در حالی‌که در گروه شاهد و پس از آن گروه TA کمترین مقدار را داشتند. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه شاهد و گروه TA در مقایسه با گروه TC وجود دارد (p<۰/۰۵). داده‌های حاصل از بررسی ایمنوگلوبولین M بیان کرد که میزان آن در گروه شاهد کمترین مقدار و در گروه TC بیشترین مقدار را داشت. تفاوت در میزان ایمنوگلوبولین M بین گروه TC با دیگر گروه‌ها معناداری بود(p<۰/۰۵). همچنین تفاوت در میزان IgM بین گروه شاهد با گروه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک نیز معنادار بود(p<۰/۰۵). نتایج مربوط به تأثیر باکتری بر عوامل ایمنی در تاس‌ماهی سیبری در جدول ۲ نمایش داده شده است).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ تأثیر سطوح مختلف باکتری *P. pentosaceus* بر عوامل رشد تاس‌ماهی سیبری

تیمار	FCR	PER	SGR (%/day)	BWI (%)	CF
TA	۱/۳۴±۰/۰۲[b]	۲/۰۵±۰/۰۴[a]	۰/۶۱±۰/۰۲[a]	۱۳۵/۹۳±۹/۶۴[a]	۰/۳۱±۰/۰۱[a]
TB	۱/۴۶±۰/۰۱[b]	۱/۸۹±۰/۰۱[b]	۰/۵۵±۰/۰۱[bc]	۱۱۷/۸۳±۳/۱۰[ab]	۰/۳۱±۰/۰۰۵[a]
TC	۱/۴۴±۰/۰۱[b]	۱/۹۲±۰/۰۱[ab]	۰/۵۸±۰/۰۱[ab]	۱۲۶/۴۸±۲/۶۹[a]	۰/۲۹±۰/۰۰۳[a]
C	۱/۶۷±۰/۰۸[a]	۱/۶۶±۰/۰۷[c]	۰/۴۹±۰/۰۲[c]	۹۹/۸۳±۴/۵۵[b]	۰/۳۱±۰/۰۰۲[a]

حروف لاتین غیرمشترک نشانهٔ معنادار بودن است ($p<0/05$).

TA= گروهی که با میزان 10^7 سلول باکتری در گرم جیره تغذیه شده بود، TB= گروهی که با میزان 10^8 سلول باکتری در گرم جیره تغذیه شده بود، TC= گروهی که با میزان 10^9 سلول باکتری در گرم جیره تغذیه شده بود و C= گروه شاهد که از غذای فاقد پروبیوتیک تغذیه شده بود.

FCR= ضریب تبدیل غذایی، PER= نرخ کارایی پروتئین، SGR= شاخص رشد ویژه، BWI = درصد افزایش وزن بدن و CF= عامل وضعیت.

جدول ۲ تأثیر سطوح مختلف باکتری *P. pentosaceus* بر عامل ایمنی در تاس‌ماهی سیبری

تیمار	لایزوزیم u/ml/min	ایمونوگلوبولین M Mg/dl	آلترناتیو کمپلمان u/ml
C	۱۴±۰/۳۳[a]	۳۷±۰/۷۲[c]	۸۸±۰/۵[b]
TA	۲۶/۳۳±۱/۸۳[a]	۵۰/۳۳±۱/۳۳[b]	۹۶±۰/۸۸[b]
TB	۲۷/۶۶±۱/۷۸[a]	۵۶/۶۶±۱/۰۰۴[b]	۱۰۴/۳۳±۱/۰۱[ab]
TC	۳۰/۳۳±۱/۲۰[a]	۷۵±۱/۴۸[a]	۱۱۷±۲/۷۵[a]

حروف لاتین غیرمشترک نشانهٔ معنادار بودن است ($p<0/05$).

TA= گروهی که با میزان 10^7 سلول باکتری در گرم جیره تغذیه شده بود، TB= گروهی که با میزان 10^8 سلول باکتری در گرم جیره تغذیه شده بود، TC= گروهی که با میزان 10^9 سلول باکتری در گرم جیره تغذیه شده بود و C= گروه شاهد که از غذای فاقد پروبیوتیک تغذیه شده بود.

بحث

پس از اولین استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، محققان اثرهای مفید این مواد بر آبزیان را مطالعه کردند. همه مطالعات به نوعی توانایی پروبیوتیک‌ها را در افزایش رشد نشان دادند (Lara-Flores et al., 2003). باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش، بخشی از مواد غذایی را تجزیه می‌کنند که در اثر این عمل، جانداران میکروسکوپی با مواد فعال فیزیولوژیک مانند آنزیم، اسیدآمینه و ویتامین‌ها را تولید می‌کنند (Moriarty et al., 1990; Bairagi et al., 2002). محققان بیان کردند که باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش، آنزیم‌های گوارشی تولید می‌کنند که سبب تسهیل مصرف غذا و هضم آن می‌شوند (Baragi et al., 2004; Wang et al., 2007). همچنین اظهار داشتند که ماهی تمایل به خوردن غذای غنی‌شده با پروبیوتیک را دارد که این منجر به افزایش رشد ماهی می‌گردد (Ferguson et al., 2010). این موارد اثباتی است بر اینکه پروبیوتیک‌ها کمک مؤثری به هضم و جذب غذا می‌کنند و سبب افزایش برخی و یا همه شاخصه‌های رشد می‌شوند. با این وجود،

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج کاملاً متفاوتی از مطالعات بر روی اثرهای پروبیوتیک در آبزیان حاصل شده است. تفاوت در نوع پروبیوتیک استفاده شده، گونه میزبان و همچنین طول مدت آزمایش، دلیل تضاد این نتایج است.

در مطالعه حاضر نیز مزایای پروبیوتیک‌ها بر تاس‌ماهی سیبری به اثبات رسید. به این صورت که نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پروبوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس موجب افزایش معناداری در شاخص‌های SGR، PER و BWI و کاهش معناداری در میزان FCR تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد شد. این پروبیوتیک چندان بر میزان CF در گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک تأثیرگذار نبود. از آنجا که این باکتری توانسته بود میزان SGR را افزایش دهد، اما بر میزان CF تأثیری نداشت. از این‌رو می‌توان بیان کرد که این باکتری تنها بر میزان افزایش وزن تأثیر داشته، اما نتوانسته سبب افزایش رشد در جهت طولی ماهی شود.

از مطالعاتی که بر پدیوکوکوس گونه اسیدلاکتیکی صورت گرفت، می‌توان به مطالعه Gatesoupe و همکاران (۲۰۰۲) اشاره کرد، مطالعات آنها نشان داد که وزن به‌دست آمده در لارو ماهی پولاک (*Pollachius pollachius*) هنگام تغذیه با آرتمیای غنی‌شده با پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی افزایش یافت. در این راستا Zhou et al., 2010 پروبیوتیک *Pedicoccus acidlactici* را به آب افزودند و در نهایت مشاهده شد که عملکرد رشد در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) مورد آزمایش بهبود معناداری پیدا کرده است. اما در تضاد با یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان به مطالعهFerguson و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد. مطالعه آنها بیان کرد که استفاده از پروبیوتیک *P. acidlactici* در جیره تیلاپیای قرمز ، بهبود معناداری در شاخص‌های FCR، PER و SGR ایجاد نکرده است. در مطالعه حاضر بیان شد که پروبیوتیک توانسته بود بر میزان SGR، FCR و PER به‌طور معنادار تأثیر بگذارد. از دلایل تفاوت این مطالعه با مطالعه حاضر را می‌توان به گونه میزبان متفاوت، سیستم گوارشی متفاوت در نتیجه تفاوت در باکتری‌های بومی موجود در دستگاه گوارش متفاوت نسبت داد.

در مطالعه‌ای نشان داده شد که عوامل رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در اثر تغذیه با *P. acidlactici* به‌عنوان پروبیوتیک به‌طور معنادار تحت تأثیر قرار نگرفت و هیچ‌گونه تفاوت معناداری بین گروه‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی پروبیوتیک و گروه شاهد یافت نشد (Merrfeld etal., 2011). تفاوت دراین مطالعه با مطالعه حاضر شاید در استفاده از گونه ماهی متفاوت باشد زیرا ماهی قزل‌آلا سردابی است و عامل دما در تأثیر پروبیوتیک بر میزبان مهم است.

استفاده از پروبیوتیک در ماهیان خاویاری نیز نتایج متفاوتی را تاکنون داشته است. در این راستا می‌توان به تحقیق انجام شده در سال ۲۰۱۱ که از باکتری‌های اسیدلاکتیکی جدا شده از روده فیل ماهی (*Huso huso*) و تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) برای همین دو ماهی استفاده شد، اشاره کرد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، هنگامی‌که باکتری مورد استفاده در یک گونه ماهی از روده همان ماهی جدا شده باشد، آنگاه نتایج مثبت بیشتری را در پی خواهد داشت. در این مطالعه به بررسی دو باکتری اسیدلاکتیک *Lactobacillus carvatus* و *Leuconostoc mesenteroides* بر رشد، بقا، فعالیت آنزیم‌های هضم و بیوتای میکروبی تاس‌ماهی ایرانی و فیل ماهی پرداخته شد. نتایج حاصل بیان کرد که غذای غنی‌شده با باکتری‌های اسیدلاکتیک موجب بهبود SGR و بقای تیمارها گردید. نکته قابل توجه در این مطالعه این بود

www.SID.ir

Archive of SID

که SGR و بقا در تاس‌ماهی ایرانی تغذیه‌شده با *L. carvatus* که از روده فیل ماهی جدا شده و فیل ماهی تغذیه شده با *L. mesenteroides* که از روده تاس‌ماهی ایرانی جدا شده، به‌طور معنادار کمتر از آن چیزی بود که در گروه شاهد مشاهده شد، اما افزایش معناداری هنگام تغذیه تاس‌ماهی ایرانی با *L. mesenteroides* و تغذیه فیل ماهی با *L. carvatus* به نسبت گروه شاهد، گزارش شد (Askarian et al., 2011). پروبیوتیک مورد استفاده در مطالعهٔ حاضر از روده تاس‌ماهی ایرانی جدا شده بود و در تغذیه تاس‌ماهی سیبری استفاده گردید. اثبات شده اگر پروبیوتیک به‌کار رفته در یک میزبان از روده همان گونه میزبان استخراج شده باشد، در نهایت نتایج بهتری را در پی خواهد داشت. پدیوکوکوس پنتوساسئوس از باکتری‌های بومی روده ماهیان خاویاری است اگرچه در روده تاس‌ماهی سیبری یافت نشد.

مطالعه‌ای دیگر که بر فیل ماهی جوان (*H. huso*) انجام شد، نشان داد که استفاده از مخمر ساکارومایسیس سروزیا به‌عنوان پروبیوتیک منجر به افزایش معنادار در شاخص رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن و وزن نهایی و کاهش معنادار در ضریب تبدیل غذایی ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی مخمر در مقایسه با ماهیان تغذیه‌شده با جیره فاقد مخمر گردید (Hoseinifar et al., 2009).

مطالعه‌ای که برای بررسی اثر *Micrococcus luteus* (که باکتری گرم مثبت و کروی است) و *Pseudomonas* (که باکتری گرم منفی و باسیل است) بر تیلاپیای قرمز (*O. niloticus*) انجام شد، نشان داد که بیشترین میزان رشد در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی *Microccocus luteus* و کمترین میزان رشد در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی *Pseudomonas* دیده شده است. این نتیجه دلیلی بر اثبات نتایج مطالعه حاضر در خصوص بهبود معنادار در عوامل SGR، PER و FCR در اثر استفاده از باکتری‌های کوکوس گرم مثبت شد (El-Rhman et al., 2009).

بر اساس اظهارات Fuller وهمکاران (۱۹۸۷) یکی از انواع عملکردهای پروبیوتیک، تحریک پاسخ ایمنی هومورال و سلولی است. در تحقیق حاضر برای نشان دادن اثر پروبیوتیک بر ایمنی میزبان، به بررسی عوامل آلترناتیو کمپلمان، ایمنوگلوبولین M و لایزوزیم پرداخته شد. کامپلمنت، از اصلی‌ترین اجزای پاسخ ایمنی هومورال است که در بروز خطر در سیستم ایمنی نقشی مهمی دارد. لایزوزیم یک آنزیم کاتیونی است که توانایی تجزیه عمده باکتری‌های گرم مثبت را دارد، همچنین نقشی مهم در ترکیب با کامپلمنت برخی باکتری‌های گرم منفی دارد. ایمنوگلوبولین M، یکی از اصلی‌ترین ایمنوگلوبولین های موجود در ماهی است و ایمنوگلوبولین‌ها از اجزای اصلی سیستم ایمنی هومورال هستند (Sun et al., 2010)

نتایج این تحقیق نشان داد که پروبیوتیک باعث افزایش معناداری بر میزان فعالیت آلترناتیوکمپلمان و ایمونوگلوبولین Mشد. از آنجا که ایمنی سلولی و ایمنی هومورال در اثر استفاد از پروبیوتیک بهبود می‌یابد، پس به افزایش در میزان آلترناتیوکمپلمان و ایمونوگلوبولین M نیز منجر می‌شود. باکتری پدیوکوکوس پنتوساسئوس میزان لایزوزیم را در گروه‌های تحت تیمار افزایش داد، اما این افزایش معنادار نبود. لایزوزیم از گلبول‌های سفید تولید می‌شود، بنابراین با افزایش در تعداد گلبول‌های سفید در اثر استفاده از باکتری، میزان لایزوزیم نیز افزایش می‌یابد. لایزوزیم از شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی است. در راستای این نتایج می‌توان به مطالعهٔ Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد. در مطالعه آن‌ها از جیره حاوی پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی در تغذیه تیلاپیای قرمز (*O. niloticus*) استفاده شد و در نهایت نشان داده شد که

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش در میزان فعالیت لایزوزیم گروه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک به نسبت گروه شاهد معنادار بود (p =۰/۰۲). تفاوت در این مطالعه با مطالعه حاضر را می‌توان به گونه میزبان متفاوت و در نتیجه سیستم ایمنی متفاوت نسبت داد. احتمال دارد باکتری مورد استفاده در این مطالعه بهتر توانسته در روده کلنی‌سازی کند و به بهبود معنادار در ایمنی میزبان منجر شود.

به گزارش محققان فعالیت کمپلمان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه‌شده با جیره حاوی *Bacillu subtilis* و *Enterococcus faecium* افزایش معناداری پیدا کرد (Panigrahi et al., 2007).

در تضاد با یافته‌های خود می‌توان به مطالعهٔ Merrifield و همکاران (۲۰۰۹) اشاره کرد. در مطالعه آنها از جیره حاوی مخلوط پروبیوتیکی (*B. Bacillu subtilis, Enterococcus faecium, licheniformis*) برای تغذیه لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) استفاده شد. در نهایت مشاهده شد که میزان فعالیت لایزوزیم در گروه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک به نسبت گروه شاهد بیشتر بود، اما این افزایش معنادار نبود. آنها همچنین بیان کردند که فعالیت کمپلمان تحت تأثیر پروبیوتیک قرار نگرفت. در تفاوت در این مطالعه با مطالعهٔ حاضر شاید بتوان علاوه بر استفاده از گونه میزبان متفاوت، شرایط پرورشی متفاوت و همچنین پروبیوتیک متفاوت، (استفاده از مخلوط پروبیوتیکی) را دانست. عملکرد نه چندان خوب باکتری در این مطالعه شاید به عدم موفقیت در کلنی‌سازی باکتری در روده میزبان بازگردد.

در مطالعه‌ای که به بررسی سویه باسیلوس (*B. claussi* و *B. pumilus*) بر عوامل ایمنی ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) پرداخته بود، مشاهده شد که فعالیت فاگوسیتوزی در ماهیانی که با جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه کرده بودند، افزایش چشم‌گیری داشت. همچنین فعالیت لایزوزیم نیز طی ۳۰ روز به‌طور معنادار تحت تأثیر جیره افزایش پیدا نکرده بود، اما در آزمایش ٦۰ روزه، فعالیت لایزوزیم به‌طور معنادار تحت تأثیر جیره افزایش پیدا کرده بود. سطح کمپلمان C۳ پس از ۳۰ روز تغذیه با جیره آزمایشی افزایش حجم پیدا کرده بود، اما سطح کمپلمان C٤ پس از ۳۰ روز تغذیه با جیره آزمایشی افزایش حجم پیدا نکرده بود. این در حالی بود که سطح هر دو کمپلمان پس از ٦۰ روز افزایش معناداری با گروه شاهد داشت. همچنین آنها بیان کردند که سطح IgM طی ۳۰ روز آزمایش با هر دو نوع پروبیوتیک، افزایش معناداری پیدا کرد. اما پس از ٦۰ روز، گروهی که از جیره حاوی *B. pumilus* استفاده کرده بود، سطح IgM آن به‌طور معناداری نسبت به گروه شاهد کمتر شد. اما تفاوتی بین سطح IgM در گروه شاهد و گروه تغذیه‌شده با جیره حاوی B. claussi پس از ٦۰ روز یافت نشد (Sun et al., 2010). در نتیجه باکتری مورد استفاده در این مطالعه توانسته بود اثرهای مثبت خود را پس از گذشت مدت زمانی بیش از ٦۰ روز اعمال کند، به عبارت دیگر، پس از گذشت این مدت زمان توانسته بود به‌خوبی در روده کلنی‌سازی کند.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک در صنعت آبزی‌پروری اثرهای مثبت بسیاری را در پی خواهد داشت و به رشد و بهره‌وری هرچه بیشتر این صنعت کمک شایانی خواهد کرد. داده‌های حاصل از عوامل رشد در این تحقیق نشان داد که استفاده از باکتری پدیوکوکوس پنتوساسئوس، به‌خصوص هنگام استفاد از دوز 10^9 سلول باکتری در گرم جیره، می‌تواند سبب بهبود شاخص‌های رشد به‌ویژه عوامل ضریب تبدیل غذایی، نرخ بازده پروتئین، شاخص رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن در تاس‌ماهی سیبری شود.

کاربرد پروبیوتیک در جیره آبزیان می‌تواند باعث

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش شاخص‌های مرتبط با ایمنی در خون آبزیان شود، که این موضوع خود به افزایش بقای آبزی کمک می‌کند. مطالعه حاضر نیز نشان داد که باکتری مورد استفاده منجر به افزایش در ایمنی تاس‌ماهی سیبری شده بود. بیشترین میزان تأثیر بر ایمنی در دوز 10^9 سلول باکتری در گرم جیر مشاهده شد. بنابراین استفاده از پروبیوتیک در آبزی‌پروری می‌تواند کمک شایانی در تحقق مهم‌ترین اهداف این صنعت یعنی افزایش رشد و بقا همچنین کاهش بیماری‌ها در نتیجه کاهش هزینه‌های تولید کند.

منابع

Abd El-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. E. and Shalaby, A. M. E. 2009. Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27: 175–180.

Al-Dohail, M. A., Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish(*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. Aquaculture Research, 40: 1642-1652.

Askarian, F., Kousha, A., Salma, W. and Ringo, E., 2011. The effect of Lacticacid bacteria on growth, digestive enzyme activity and gut microbita in Persian sturgeon*(Acipenser persicus*) and beluga*(Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 17: 488-495.

Aubin, J., Gatesoupe, F. J., Labbe, L. and Lebrun, L. 2005 Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*).*Aquaculture Research*. 36, 758-767.

Austreng, E. 1978.Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*. 13: 265-272.

Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K. and Ray, A. K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10, 109–121.

Bairagi, A., SarkarGhosh, K., Sen, S. K. and Ray, A. K., 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilto) fingerling. *Aquaculture research*, 35, 436-446.

De Silva, S. S., and Anderson, T. A. 1995. ln: Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman and Hall,London, 319p.

Ferguson, R. M. W., Merrifield1, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa1, S., Picchietti,**S.,**

Balcazar, J. L. and Davies, S.J. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus).Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.

Gatesoupe, F. J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemianauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212, 347–360.

He, S., Liu, W., Zhou, Zh., Wei Mao, W., Ren, P., Marubashi, T. and Ringo, E. 2011. Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture research& development*.

Helland, S. J., GrisdaleHelland, B., and Nerland, S. 1996. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture*, 139: 157-163.

Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A. and Merrifield, D. L. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiaevar.ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318: 90–94.

Hevroy, E. M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M., and Hemre, G.I. 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*L) fed increased level of fish protein hydrolysate duringa period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11: 301-313.

Irianto, A and Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25: 633–642.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan,M, J. and Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274:1–14.

Khoshbavar-Rostami, H. A., Soltani, M., Hassan,

www.SID.ir

Archive of SID

Hernandez, M. D. 2007. Effect of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*, 263: 211-219.

Pyka, J and Kolman, R. 2003. Feeding intensity and growth of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandet in pond cultivation. Archives of Polish Fisheries, 11:287-294.

Ringø, E., Strøm, E. and Tabacheck, J. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26, 773–789.

Shelby, R. A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. and Delaney, M. A. 2006. Effects of probiotic supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Aquaculture, 18, 22–34.

Shelby, R. A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. and Klesius, P. H. 2007. Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young Channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Applied Aquaculture, 19, 81–91.

Son, V. M., Chang, Ch. Ch., Wu, M. Ch., Guu, Y. K., Chiu, Ch. H and Cheng, W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinepheluscoioides* . *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 691–698.

Sun, Y. Zh., Yang, H. L., Ma, R. L. and Lin, W. Y. 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides. Fish & Shellfish Immunology*, 29, 803e809.

Wang, Y. B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269, 259–264.

Wang , Y. B., Li, J. R. and Lin, J.2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281: 1–4.

Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. and Li, W. 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia(*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology Biochemical*, 36: 501-509.

M. D. 2006. Some hematological and biochemical changes in blood serum of beluga (*Huso huso*) after chronic exposure to diazinone. *Iranian Journal of Fisheries Science*. 5(2):53–66.

Lara-flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., López- Madrid ,W. 2003.Use of the bacteria Streptococcus faecium and Lactobacillus acidophilus, and the yeast Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* , 216:193-201.

Martınez Cruz,P., Ibanez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A. and Ramırez Saad, H. C. 2012. Use of probiotics in aquaculture. International Scholarly Research Network ISRN Microbiology , 13 pages.

Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R. T. M. and Davies, S. J. 2009. Probiotic applications for rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss walbaum*) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacalture nutrition*,10: 1365- 2095.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B. and Davies, S. J. 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidlactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss walbaum*). *Aquacalture nutrition*, 17: 73-79.

Moriarty, D. J. W. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Lesel, R. (Ed.), Microbiology of Poecilotherms. Elsevier Amsterdam, New York, pp. 217–223

Nikkhoo, M., Yusefiyan, M. and Safari, R. 2010. Effect of aqualase as a probiotic on growth and survival of Cyprinidae*(Cyprinus carpio*). Marine science and technology.(translated in Persian)

Piedecausa, M. A., Mazon, M. J., Garcia, B. G., Ortuno, J., Esteban, M. A., Mulero, V., Meseguer, J. 1998. Methods for the studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream (*Sparus aurata* L.) serum. Methodology in fish disease research. Aberdeen, 125- 127.

www.SID.ir